

D.O. Kornilov – Assay Assistant of Laboratory  
M.A. Tryapitsyn – Assay Assistant of Laboratory  
N.V. Savchenko – Candidate of Sciences (Medicine), Assistant  
D.L. Zornikov – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor  
\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
dinechaeva13@yandex.ru

УДК 614.4

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОБНАРУЖЕНИЯ НОРОВИРУСА GI В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Патрушева Анастасия Константиновна<sup>1,2</sup>, Чалапа Владислав Игоревич<sup>1</sup>, Итани Тарек Мохамедович<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное бюджетное учреждение науки Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»

Екатеринбург, Россия

### Аннотация

**Введение.** Норовирусы являются распространённой причиной небактериального гастроэнтерита, преобладающими геногруппами являются GI и GII. Из существующих методов детекции возбудителя приемлемые операционные характеристики демонстрирует лишь полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). В то же время разработка подобных тест-систем затруднена ввиду генетической изменчивости возбудителя, при этом ранее были описаны сложности в подборе олигонуклеотидов для детекции норовируса GI. **Цель исследования** – осуществить дизайн олигонуклеотидов для детекции норовирусов GI с применением ПЦР-РВ и оптимизировать тест-систему на их основе. **Материал и методы.** Была сформирована сплошная выборка из 1189 нуклеотидных последовательностей генома норовируса GI. К консервативному участку генома по выровненным последовательностям с помощью пакета Rprimer и программы UGENE были подобраны праймеры и зонды. Для экспериментальной части исследования использовались образцы фекалий больных гастроэнтеритом (n=125), включая образцы с положительными результатами ПЦР-теста на норовирус GI (n=32). В качестве золотого стандарта использовалась тест-система АмплиСенс® Norovirus GI/GII-FL (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). **Результаты.** При анализе выравнивания нуклеотидных последовательностей возбудителя была получена одна пара праймеров и шесть вариантов зонда. Наилучший результат ПЦР-РВ был получен с использованием зонда, имеющего модификацию в виде замкнутой нуклеиновой кислоты, что позволило проводить отжиг и элонгацию при 60°C. Полученная тест-система на ограниченной выборке образцов продемонстрировала полную сходимость с «золотым стандартом» (чувствительность 100%, специфичность 100%). **Выводы.** Был осуществлен дизайн праймеров и зонда TaqMan® для детекции норовирусов GI в ПЦР-РВ с учетом известных технических сложностей разработки тест-системы для детекции данного возбудителя. Результаты исследований на ограниченной выборке с экспериментальной тест-системой полностью сошлись с результатами для «золотого стандарта», показав валидность предлагаемого метода.

**Ключевые слова:** норовирус GI, ПЦР-РВ, олигонуклеотиды.

## DEVELOPMENT OF A NOROVIRUS GENOGROUP I QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY

Patrusheva Anastasia Konstantinovna<sup>1,2</sup>, Chalapa Vladislav Igorevich<sup>1</sup>, Itani Tarek Mukhamedovich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Budgetary Institution of Science «Federal Research Institute of Viral Infections «Virome»  
Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Health Wellbeing

<sup>2</sup>Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin

Yekaterinburg, Russia

### Abstract

**Introduction.** Norovirus is a common cause of non-bacterial gastroenteritis, and genogroups GI, GII are predominant. Among the existing detection assays, only quantitative polymerase chain reaction (qPCR) demonstrates acceptable accuracy. Nevertheless, the development an assay is difficult due to the genetic variability of the pathogen and specific obstacles in oligonucleotides design for norovirus GI as it has been described previously. **The aim of the study** - to design oligonucleotides for the detection of norovirus GI in qPCR and to optimize the experimental assay. **Material and methods.** A total sample of 1189 nucleotide sequences of norovirus GI genome was formed. Primers and probes were selected targeting the conservative region based on aligned sequences using the R primer package and the UGENE

software. For the experimental part of the study, fecal samples from patients with gastroenteritis (n=125) were used, including positive samples for norovirus GI (n=32). The AmpliSens® Norovirus GI/GII-FL (FBIS CRIE of Rospotrebnadzor, Moscow) assay was used as the gold standard. **Results.** After the alignment of the nucleotide sequences, one pair of primers and six probe variants were selected. The best performance was achieved using a probe including locked nucleic acid modification, which made it possible to carry out the annealing and extension stages at 60° C. On a limited batch of samples the assay demonstrates full concordance with the gold standard (100% accuracy). **Conclusion.** A Taqman qPCR assay for the detection of norovirus GI was developed, overcoming previously described obstacles in terms of the pathogen's genetic variation. On a limited number of samples, the assay demonstrates acceptable accuracy comparing with the gold standard.

**Keywords:** norovirus GI, qPCR assay, oligonucleotides.

## ВВЕДЕНИЕ

Норовирусы являются основной причиной небактериального гастроэнтерита во всех возрастных группах по всему миру, и представляют угрозу для общественного здоровья, вызывая вспышки в медицинских организациях и различных организованных коллективах [1]. Норовирусы относятся к РНК-содержащим вирусам, характеризуются значительным генетическим разнообразием и быстро эволюционируют. Геном возбудителя разделен на три открытые рамки считывания (ORF), где ORF1 кодирует неструктурные вирусные белки, включая РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), а ORF2 и ORF3 кодируют основной (VP1) и второстепенный (VP2) структурные белки. Генетически норовирусы можно разделить на 10 геногрупп (GI – GX), из которых основными возбудителями норовирусной инфекции (НВИ) у людей являются геногруппы GI и GII [2].

Эпидемиологическими особенностями НВИ являются длительное выделение возбудителя из организма больных, реализация различных путей передачи (пищевого, водного, контактно-бытового), высокая контагиозность [3]. В сочетании со сложностями культивирования норовирусов, затрудняющими создание эффективной вакцины, эти обстоятельства обуславливают важность разработки мер неспецифической профилактики норовирусной инфекции (НВИ), а также совершенствования системы эпидемиологического надзора и лабораторной диагностики норовирусов [4].

На сегодняшний день золотым стандартом для обнаружения РНК норовируса в клинических образцах стала полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Наиболее консервативной областью генома норовируса является участок на стыке открытых рамок считывания (ОРС) 1 и 2, который и является основной мишенью для подбора специфичных праймеров и зондов. Несмотря на достигнутые успехи в данной области, отдельную сложность представляет разработка метода обнаружения норовируса GI. Высокая генетическая изменчивость возбудителя затрудняет подбор специфических праймеров и зондов, из-за чего существующие тест-системы имеют ряд недостатков (олигонуклеотиды нацелены на недостаточно консервативные области, образуют димеры, имеют низкую температуру плавления) [5]. Кроме того, в связи с упомянутой изменчивостью существует рекомендация проводить повторный подбор олигонуклеотидов по мере накопления мутаций в соответствующей части генома [6].

**Цель исследования** – осуществить дизайн праймеров и зондов TaqMan® для детекции норовирусов GI с применением ПЦР в режиме реального времени и оптимизировать тест-систему на их основе.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С целью подбора праймеров и зондов была сформирована сплошная выборка нуклеотидных последовательностей генома норовируса GI, содержащих область стыка ОРС1 и ОРС2. Последовательности в количестве 1189 штук были отобраны из базы данных NCBI Virus за период с 2019 по 2023 гг. Выравнивание было выполнено с использованием алгоритма MAFFT. Дизайн праймеров и зондов был осуществлен с помощью пакета Rprimer на языке программирования R, а также с помощью программы UGENE (Унипро, Новосибирск). Расчетные температуры плавления праймеров были получены с помощью онлайн-сервиса OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies Inc., США). Синтез олигонуклеотидов был выполнен ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва).

Экспериментальная часть исследования была выполнена на базе лаборатории энтеральных вирусных инфекций ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора. Для отработки метода ПЦР были использованы образцы клинического материала (фекалии) от больных острой кишечной инфекцией (ОКИ) – жителей Свердловской области, в которых обнаруживались РНК норовируса GI либо антиген норовируса методом ИФА. Упомянутые образцы первично исследовались в медицинских организациях по месту обращения больных и направлялись для дальнейшего исследования в Виром. Для проверки специфичности экспериментального метода были использованы образцы биоматериала от больных острым гастроэнтеритом, вызванным возбудителями, отличными от норовируса GI.

Из полученных образцов фекалий готовили фекальную суспензию и выделяли нуклеиновые кислоты с использованием коммерческого комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-Л» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

В качестве «золотого стандарта» обнаружения норовируса GI использовали набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® Norovirus GI/GII-FL (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени с использованием подобранных праймеров и зонда проводили с помощью готовой смеси для ПЦР 5X qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия). Программа амплификации включала предварительный нагрев при 95°C в течение 5 минут и далее 45 циклов амплификации с денатурацией при 95 °C в течение 15 секунд и отжигом/элонгацией в течение 1 минуты, температура этого этапа подбиралась путем ПЦР в температурном градиенте. В работе использовался детектирующий амплификатор DTPRime-4M1 (ООО «ДНК-технология», Москва).

Для визуализации продукта ПЦР провели электрофорез в 1,0%-ом агарозном геле с бромистым этидием.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

После выравнивания нуклеотидных последовательностей была подобрана пара праймеров, которые ограничивают участок длиной 94 п.н., а также несколько вариантов зондов (таблица 1), при этом обратный праймер совпал с описанным ранее [7]. Для увеличения температуры плавления некоторых зондов, а также повышения специфичности их отжига, в их структуру была внесена модификация в виде замкнутой нуклеиновой кислоты (locked nucleic acid, LNA) [8]. В качестве флуоресцентной метки и ее гасителя были использованы FAM (5(6)-карбоксифлуоресцеин) и BHQ1 соответственно.

Таблица 1.

Последовательности полученных олигонуклеотидов, предназначенных для обнаружения норовируса GI

| №        | Обозначение праймера (зонда) | Длина последовательности | T <sub>m</sub> , °C |
|----------|------------------------------|--------------------------|---------------------|
| Праймеры |                              |                          |                     |
| 1        | Nq1F                         | 18                       | 63,2                |
| 2        | Nq1R                         | 23                       | 62,0                |
| Зонды    |                              |                          |                     |
| 1        | Nq1PaL                       | 20                       | 66,3                |
| 2        | Nq1PbL                       | 20                       | 66,3                |
| 3        | Nq1PcL                       | 22                       | 68,0                |
| 4        | Nq1PdL                       | 22                       | 68,0                |
| 5        | Nq1Pe                        | 25                       | 69,0                |
| 6        | Nq1Pf                        | 25                       | 71,4                |

Примечание: М – А или С; R – А или G; Y – С или Т; нижнее подчеркивание – LNA (locked nucleic acid).

При проведении ПЦР в градиенте температур и с различными концентрациями олигонуклеотидов наилучший результат был получен с использованием праймеров Nq1F и Nq1R в концентрации 800 нМ на реакцию, зонда Nq1PdL – 400 нМ, температуры отжига и элонгации 60 °С. Отсутствие образования неспецифических продуктов амплификации было доказано путем проведения гель-электрофореза ампликонов в агарозном геле.

Для проверки предлагаемой тест-системы на специфичность случайным образом было отобрано 93 образца кДНК от больных ОКИ, предварительно проанализированных с помощью тест-системы АмплиСенс® Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL с использованием реагентов, нацеленных только на выявление норовирусов GII, из которых 43 были идентифицированы как положительные на наличие данного возбудителя. Ни в одном из образцов амплификация с предлагаемыми праймерами и зондами не наблюдалась, тем самым можно заключить, что специфичность предлагаемой тест-системы составляет 100 % (таблица 2).

Проверка чувствительности была проведена путем сравнения предлагаемой тест-системы с «золотым стандартом» (АмплиСенс® Norovirus GI/GII-FL) на 32 имеющихся образцах с заведомо положительным результатом ПЦР-теста на наличие в них норовируса GI: из них 16 оказались положительными, а 16 – отрицательными в результате использования обеих тест-систем. Таким образом, чувствительность разработанной тест-системы составила 100 %. При этом в среднем значение порогового цикла (Ct) для предлагаемого варианта ПЦР-теста ниже на 2,8 единицы, чем для АмплиСенс® Norovirus GI/GII-FL. Из всех проанализированных образцов лишь в одном случае Ct при использовании «золотого стандарта» оказался выше на 0,7. Наличие отрицательных результатов может быть связано с неоптимальными условиями транспортировки образцов в лабораторию или их длительным хранением.

Таблица 2.

Сравнение предлагаемой тест-системы на основе ПЦР-РВ для выявления норовирусов GI с «золотым стандартом»

| Сравниваемые тест-системы |               | АмплиСенс® Norovirus GI/GII-FL<br>(«золотой стандарт») |                              |
|---------------------------|---------------|--------------------------------------------------------|------------------------------|
|                           |               | Положительные                                          | Отрицательные                |
| Экспериментальный метод   | Положительные | 16<br>Истинно положительные                            | 0<br>Ложно отрицательные     |
|                           | Отрицательные | 0<br>Ложно положительные                               | 109<br>Истинно отрицательные |

## ОБСУЖДЕНИЕ

НВИ является широко распространённым заболеванием и значимой угрозой для общественного здоровья, а его диагностика и расследование вспышек требует применения ПЦР-РВ [9]. Хотя норовирус GI в целом является относительно редким возбудителем, в отдельных исследованиях его доля среди случаев НВИ составляет 42% [10]. Как было показано ранее, разработка метода обнаружения норовируса GI в ПЦР-РВ значительно осложнена высокой генетической изменчивостью данного возбудителя [5].

Предлагаемый метод имеет преимущества в сравнении с использованным «золотым стандартом». Так, он отличается меньшим средним значением Ct, что соответствует почти десятикратно меньшему значению предела обнаружения. Кроме того, представленный протокол требует меньшего объема раствора кДНК по сравнению с коммерческой тест-системой.

Настоящее исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, поскольку изучаемый возбудитель редкий, выборка положительных образцов на данном этапе невелика и требуются дополнительные исследования для проверки чувствительности предлагаемого метода. Во-вторых, использованный в качестве «золотого стандарта» метод сам по себе основан на амплификации нуклеиновых кислот, а не на прямом обнаружении возбудителя методом культивирования, что связано с проблемой отсутствия чувствительной клеточной линии. В-третьих, на данном этапе исследования авторами не проверялась возможность применения

полученных праймеров и зонда для мультиплексного анализа, что предполагается выполнить в дальнейшем.

## **ВЫВОДЫ**

1. Был осуществлен дизайн праймеров и зонда TaqMan® для детекции норовирусов GI с применением ПЦР в режиме реального времени с учетом известных технических сложностей разработки тест-системы для детекции данного возбудителя.

2. В результате оптимизации разработанной тест-системы были подобраны оптимальные условия проведения ПЦР-РВ – температурный режим и концентрация праймеров и зонда.

3. Результаты исследований на ограниченной выборке с экспериментальной тест-системой полностью сошлись с результатами для «золотого стандарта», показав валидность предлагаемого метода.

## **СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: A meta-analysis on 6 years of research from 2015 to 2020 / M. Farahmand, M. Moghoofoei, A. Dorost [et al.] // *Reviews in Medical Virology*. – 2021. – Vol. 32, № 1. – P. 2237–2255.
2. Single-step RT-PCR assay for dual genotyping of GI and GII norovirus strains / P. Chhabra, H. Browne, T. Huynh [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2021. – Vol. 134. №104689. – P. 145–159.
3. Норовирусная инфекция (обзор литературы) / Н.И. Хохлова, Д.В. Капустин, Е.И. Краснова [и др.] // *Журнал инфектологии*. – 2018. – Т. 10, № 1. – С. 5–14.
4. Эпидемиологическая характеристика норовирусной инфекции / А.А. Косова, В.И. Чалапа, Т. М. Итани, [и др.] // *Уральский медицинский журнал*. – 2022. – Т. 21, № 3. – С. 114–128.
5. Kulis-Horn R.K. Evaluation of a laboratory-developed test for simultaneous detection of norovirus and rotavirus by real-time RT-PCR on the Panther Fusion® system / R.K. Kulis-Horn, C. Tiemann // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 39, № 1. – P. 103–112.
6. Vinjé J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus / J. Vinjé // *Journal of Clinical Microbiology*. – American Society for Microbiology (ASM), 2015. – Vol. 53, № 2. – P. 373–381.
7. Etiological Role of Viruses in Outbreaks of Acute Gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005 / S. Svraka, E. Duizer, H. Vennema [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2007. – Vol. 45, № 5. – P. 1389–1394.
8. Vester B. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA/ B. Vester, J. Wengel // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43, № 42. – P. 13233–13241.
9. Redesigned Duplex RT-qPCR for the Detection of GI and GII Human Noroviruses / D. Liu, Z. Zhang, Q. Wu [et al.] // *Engineering*. – 2020. – Vol. 6, № 4. – P. 442–448.
10. Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека на территории Свердловской области за 2022 год / Р.О. Быков, Т.М. Итани, В.И. Чалапа [и др.] // *Сборник статей VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов “Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения”*. – Екатеринбург, 2023. – С. 1921–1926.

## **Сведения об авторах**

А.К. Патрушева\* – студент магистратуры  
В.И. Чалапа – научный сотрудник лаборатории  
Т.М. Итани – ведущий научный сотрудник

## **Information about the authors**

A.K. Patrusheva – Student  
V.I. Chalapa – Researcher  
T.M. Itani – Senior Researcher

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
AnaSPK@yandex.ru

УДК 616-036.22

## **ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ НОСИТЕЛЕЙ HBSAG** Сторожев Александр Анатольевич<sup>1</sup>, Питерский Михаил Валерьевич<sup>1</sup>, Кухаркин Владимир Николаевич<sup>2</sup>, Альбрехт Ирина Львовна<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup>ГАУЗ СО «ГКБ № 14»

Екатеринбург, Россия

## **Аннотация**

**Введение.** В настоящее время скрининговые лаборатории в основном проводят исследование образцов крови на маркеры вирусного гепатита В (ГВ) высоко специфичными серологическими методами, например, с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Однако серологические тесты, такие как ИФА, могут демонстрировать